

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09127116 A**

(43) Date of publication of application: **16 . 05 . 97**

(51) Int. Cl

G01N 33/566
B01J 20/26
C12N 11/00

(21) Application number: **07284974**

(22) Date of filing: **01 . 11 . 95**

(71) Applicant: **AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL**

(72) Inventor: **MINOURA NORIHIKO**
MAACHIN BUROO

(54) SUBSTANCE WITH PROTEIN MOLECULE DISCRIMINATING FUNCTION

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To manufacture a substance having a protein discriminating function at a low cost by forming a water-insoluble polymer membrane having a protein molecule shape die on the surface of a base.

SOLUTION: Protein and a cross linking agent constituted of a vinyl monomer such as acrylic acid and a water-soluble compound having at least two vinyl linkages in a molecule are dissolved in water, an aqueous solution, or a mixed liquid (aqueous medium) of water and alcohol to form a polymerization aqueous

solution, it is polymerized on a porous carrier such as silica gel fine grains, and a water-insoluble polymer membrane containing protein is formed on the surface of the carrier. An aqueous medium is kept in contact with the polymer membrane, protein is eluted and removed, and fine grains made of the polymer membrane having a protein shape die on the surface are obtained. This substance has a function selectively capturing specific protein, i.e., protein molecule discriminating function, it can be advantageously utilized as a prosthesis antibody it has thermal stability, and it can be reproduced for use.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-127116

(43) 公開日 平成9年(1997)5月16日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/566			G 0 1 N 33/566	
B 0 1 J 20/26			B 0 1 J 20/26	H
C 1 2 N 11/00			C 1 2 N 11/00	

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平7-284974

(22) 出願日 平成7年(1995)11月1日

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 箕浦 聡彦

茨城県つくば市東1丁目1番 工業技術院
物質工学工業技術研究所内

(72) 発明者 マーチン プロー

茨城県つくば市東1丁目1番 工業技術院
物質工学工業技術研究所内

(74) 指定代理人 工業技術院物質工学工業技術研究所長

(54) 【発明の名称】 タンパク質分子識別機能を有する物質

(57) 【要約】

【課題】 タンパク質に対して識別機能をもつ安価な物質及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 支持体上に形成されたタンパク質の分子形状鑄型を有する水不溶性重合体膜からなり、該タンパク質の分子形状鑄型は、該水不溶性重合体膜中にあらかじめ含有させたタンパク質の溶出除去跡に形成された微細空孔であることを特徴とするタンパク質分子識別機能を有する物質。支持体上にタンパク質を含有する水不溶性重合体膜を形成する工程と、該水不溶性重合体膜からそれに含まれるタンパク質を溶出除去させる工程からなることを特徴とするタンパク質分子識別機能を有する物質の製造方法。前記タンパク質分子識別機能を有する物質からなる人工抗体。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 支持体上に形成されたタンパク質の分子形状鑄型を有する水不溶性重合体膜からなり、該タンパク質の分子形状鑄型は、該水不溶性重合体膜中にあらかじめ含有させたタンパク質の溶出除去跡に形成された微細空孔からなることを特徴とするタンパク質分子識別機能を有する物質。

【請求項 2】 該支持体が多孔質粒子である請求項 1 の物質。

【請求項 3】 支持体上にタンパク質を含有する水不溶性重合体膜を形成する工程と、該水不溶性重合体膜からそれに含まれるタンパク質を溶出除去させる工程からなることを特徴とするタンパク質分子識別機能を有する物質の製造方法。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 の物質からなる人工抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、タンパク質分子を識別する機能を有する物質、その製造方法及び人工抗体に関するものである。本発明の物質は、タンパク質分子を識別する機能を有する点で抗体と同種の機能を有する。従って、多種類のタンパク質混合物から特定のタンパク質を分離精製するためのアフィニティクロマトグラフ用担体として、また、特定のタンパク質を検出分析するための試薬あるいはセンサー用感応物質などとして多方面に利用できる。

【0002】

【従来の技術】 近年、バイオテクノロジーの分野、および病気の診断・治療において、タンパク質の利用が盛んになってきた。タンパク質には多くの種類があり、また一般に混合物として存在する。これらのタンパク質を利用するためには、所望するタンパク質を分離精製して高純度でかつ未変性のタンパク質を取り出す必要がある。現在、特定のタンパク質を識別する方法としては動物体に形成させたその抗体を用いるのが一般的である。しかしながら抗体の形成には長時間かかり、しかも生体を用いなければならないためその管理が煩雑でまた極めて高価につくなどの点が問題となっている。したがって、所定のタンパク質に対して抗体と同様の識別機能をもつ安価な物質の開発が望まれていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、タンパク質に対して識別機能をもつ安価な物質及びその製造方法を提供することをその課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、タンパク質に対して識別機能をもつ物質を経済的に得べく鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至ったすなわち、本発明によれば、支持体上に形成されたタンパク質の分

子形状鑄型を有する水不溶性重合体膜からなり、該タンパク質の分子形状鑄型は、該水不溶性重合体膜中にあらかじめ含有させたタンパク質の溶出除去跡に形成された微細空孔からなることを特徴とするタンパク質分子識別機能を有する物質の製造方法が提供される。また、本発明によれば、支持体上にタンパク質を含有する水不溶性重合体膜を形成する工程と、該水不溶性重合体膜からそれに含まれるタンパク質を溶出除去させる工程からなることを特徴とするタンパク質分子識別機能を有する物質が提供される。さらに、本発明によれば、前記タンパク質分子識別機能を有する物質からなる人工抗体が提供される。

【0005】

【発明の実施の形態】 本発明のタンパク質分子識別機能を有する物質は、水不溶性重合体中にタンパク質の分子形状鑄型を形成したものであり、このタンパク質分子の形状鑄型は、タンパク質を含有する水不溶性重合体膜からそのタンパク質を溶出除去した跡に形成される微細空孔からなるものである。この場合のタンパク質としては、従来公知の各種のタンパク質、例えば、酵素タンパク質、細菌タンパク質、微生物タンパク質、抗原タンパク質、動植物タンパク質等の生体タンパク質の他、各種の合成タンパク質が挙げられる。

【0006】 本発明の物質は、支持体上にタンパク質を含む水不溶性重合体膜を形成する工程（第 1 工程）と、この水不溶性重合体膜からそのタンパク質を溶出除去する工程（第 2 工程）から製造される。第 1 工程の実施に際しては、ビニルモノマーとその架橋剤とタンパク質を水性媒体に溶解させてタンパク質を含む重合性水溶液を調製する。ビニルモノマーとしては、水溶性のものであれば任意のものを用いることができる。このようなものとしては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、スチレンスルホン酸、これら酸のアルカリ金属塩、アクリルアミド、メタクリルアミド、N、N-ジメチルアミド等が挙げられる。これらのビニルモノマーは単独又は 2 種以上の混合物の形で用いられる。架橋剤としては、分子中にビニル結合を少なくとも 2 個有する水溶性化合物が用いられる。このようなものとしては、例えば、N、N'-（1，2-ジヒドロキシエチレン）-ビスアクリルアミド、N、N'-メチレンビスアクリルアミド等を挙げることができる。水性媒体としては、水、水溶液又は水と水溶性有機溶媒（アルコール等）との混合液等が用いられる。また、重合性水溶液の pH は、タンパク質の変性を生じさせないように、3~10、好ましくはタンパク質の等電点の pH に保持するのがよい。架橋剤の使用割合は、ビニルモノマー 100 重量部当り、好ましくは 30 重量部以上であるが、できるだけ多い方がよい。実際上はその水性媒体の最大溶解量にするのがよい。タンパク質の使用割合は、ビニルモノマー 100 重量部当り、10 重量部以上であるが、できるだけ多い方が好ま

しい。水溶液中のビニルモノマーの濃度は、水性媒体1リットル中、20g以上であるが、タンパク質の変性が生じない範囲でできるだけ多い方が好ましい。本発明の第1工程においては、前記重合性水溶液を支持体上で重合させ、支持体表面にタンパク質を含む水不溶性重合体膜を形成させる。この場合、重合性水溶液には慣用の重合開始剤（例えば、過硫酸アンモニウム等）及び重合促進剤（例えば、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン等）が適量添加される。重合温度はタンパク質の変性を防ぐためにできるだけ低い温度が好ましく、30℃以下の温度の使用が好ましい。

【0007】前記水不溶性重合体膜支持体としては、無機系又は有機系の固体物質が用いられ、これらのものは多孔質であっても非多孔質であってもよいが、好ましくは多孔質物質である。多孔質物質の場合、その平均細孔径は1~50nm、好ましくは5~15nmであり、その比表面積は50~1000m²/g、好ましくは100~800m²/gである。無機系支持体としては、シリカゲル、アルミナ、チタニア、ジルコニア、シリカアルミナ、ゼオライト、ガラス等が挙げられるが、シリカゲルの使用が好ましい。有機系支持体としては、メラミン樹脂ビーズの如き硬化樹脂ビーズが好ましく使用される。支持体の形状は、粉末状、粒状、プレート状等の各種の形状であることができる。支持体としては、重合体膜の結合強度を高めるために、その表面にビニル基を結合させたものの使用が好ましい。このようなビニル基を表面に有する支持体は、ビニル基を有するシランカップリング剤を用いて支持体を表面処理することにより得ることができる他、アミノ基等の活性水素を有する官能基を表面に有する支持体に塩化アクリロイル等の反応性ビニル化合物を反応させることによって得ることができる。このようなビニル基を有する支持体を用いるときには、支持体上に形成される重合体膜は、このビニル基と反応結合しているため、支持体に強固に結合したものとなる。

【0008】本発明の第2工程においては、前記のようにして得られた支持体上に形成された重合体膜から、それに含まれるタンパク質を溶出除去させる。このためには、重合体膜にタンパク質に溶解性を示す液体を接触させればよい。この場合の溶出用液体としては、通常、水性媒体が用いられる。この場合の水性媒体としては、水、水溶液、水と水溶性有機溶媒との混合液を示すことができる。タンパク質が酵素等の生体タンパク質の場合、そのタンパク質の変性を生じさせないように、リン酸二水素ナトリウム水溶液を用いるのが好ましい。タンパク質溶出温度は、5~40℃、好ましくは10~30℃である。また、タンパク質の溶出量は、重合体膜中に含まれる全タンパク質量の30重量%以上、好ましくは80重量%以上である。前記のようにしてタンパク質の溶出除去された重合体膜中には、タンパク質の溶出跡が

微細空孔として形成されるが、このタンパク質の溶出跡の微細空孔は、タンパク質の分子状鑄型として作用する。即ち、このタンパク質が溶出除去された重合体膜に、タンパク質混合物を接触させると、そのタンパク質混合物のうちの前記溶出除去されたタンパク質と同種の分子形状のタンパク質がそのタンパク質溶出跡の微細空孔に選択的に捕捉される。本明細書中で言う「タンパク質の分子状鑄型」とは、このようなタンパク質の選択的捕捉作用を示すタンパク質溶出跡の微細空孔を意味するものである。本発明におけるタンパク質の分子状鑄型は、単なるタンパク質の形だけではなく、タンパク質表面に存在するペプチド基、アミノ基、イミダゾール基、アルギニル基、カルボキシル基、水酸基などの官能基と、重合体に含まれるカルボキシル基、アミド基、水酸基などの官能基との間の水素結合、イオン結合、疎水結合などによる多点の分子認識相互作用を含むものである。つまり、タンパク質の形、大きさだけの情報でなく、タンパク質表面のどの位置にどの官能基が存在するのかの認識作用を含むものである。

【0009】

【実施例】次に本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0010】実施例1

アミノ基を表面にもつ粒径0.01mmの多孔性シリカゲル（Lic h r o s o r b-NH₂）に、氷冷下シクロヘキサン中にて塩化アクリロイルを反応させてビニル基を表面にもつ多孔性シリカゲル[Lic h r o s o r b-NH-COCHCH₂]を調製した。これと別にアクリル酸（0.250ml）、アクリルアミド（230mg）、N, N'-(1, 2-ジヒドロキシエチレン)-ビスアクリルアミド（120mg）、N, N'-メチレンビスアクリルアミド（130mg）および12mMリン酸二水素ナトリウム水溶液（12ml）を混合してpHを5.6に調節したモノマー混合溶液を作成した。このモノマー混合溶液（3ml）に、上記調製したビニル基を表面にもつ多孔性シリカゲル（1g）および酵素グルコースオキシダーゼ（EC1.1.3.4）（18mg）を混合溶解させ、その溶液中に窒素ガスを導入して溶存酸素を追い出した。この溶液に重合開始剤として40%過硫酸アンモニウム水溶液（0.150ml）および重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（0.120ml）を加えて、この混合溶液を直ちに遠心器にて室温下で毎分3000回転で10分間遠心した。遠心終了後、静置してさらに3時間重合反応させた。固体生成物から多孔性シリカゲルを含む部分を破碎して取り出した。このLic h r o s o r b-重合体膜複合体からなる微粒子を12mMリン酸二水素ナトリウム水溶液（4ml、pH5.6）で7回洗浄して酵素を前記複合体から溶出除去した。こうしてシリカゲル微粒子を担体とし、タンパク質形状鑄型を

表面に有する重合体膜からなる微粒子を得た。収量0.25g。

【0011】実施例2

実施例1で調製した微粒子に対するタンパク質分子の識別試験をタンパク質の再結合実験により行った。濃度0.5mg/100mlのグルコースオキシダーゼと濃度1mg/100mlのグルコースデヒドロゲナーゼ(EC1.1.47)との混合溶液に試験すべき微粒子を5分間浸漬した後、その上澄溶液を採取した。いずれの酵素が特異的に微粒子に再結合したか知るため、この上澄溶液のそれぞれの酵素の活性を求めた。グルコースデヒドロゲナーゼの酵素活性に対するグルコースオキシダーゼの酵素活性の比の差異を検べた結果、グルコースオキシダーゼは、グルコースデヒドロゲナーゼよりも、選択的に微粒子に結合されていることが確認された。 castingに結合したグルコースオキシダーゼは、乾燥微粒子100mg当り0.4μgであった。この結果は、重合体膜中にグルコースオキシダーゼで castingが形成されていることを示している。

【0012】実施例3

実施例2において、濃度1mg/100mlのグルコースデヒドロゲナーゼの代りに0.77mg/100mlのグルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ((EC1.1.49)を用いる以外は同様に、実施例1で調製した微粒子に対するタンパク質の再結合試験を行った。グルコースオキシダーゼは、グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼよりも多く結合した。この結果は、重合体膜中にグルコースオキシダーゼで castingが形成されていることを示す。

【0013】実施例4

実施例2において、酵素グルコースオキシダーゼおよびグルコースデヒドロゲナーゼで再結合試験を行った後の微粒子を12mMリン酸二水素ナトリウム水溶液(4ml、pH5.6)で7回洗浄することにより再活性化粒子を得ることができた。つまり本発明の物質は再使用可能であることがわかった。

【0014】実施例5

* 実施例1において作成したモノマー混合溶液(9ml)に、ビニル基を表面にもつ多孔性シリカゲル(3g)と酵素グルコースオキシダーゼ(55mg)とを混合溶解させ、その溶液中に窒素ガスを導入して溶存酵素を追い出した。この溶液に重合開始剤として10%過硫酸アンモニウム水溶液(0.900ml)および重合促進剤としてN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン(0.360ml)を加えて、この混合溶液を直ちに遠心器にて室温下で毎分3000回転で10分間遠心した。遠心終了後、静置して重合反応をさらに16時間継続させた。固体状重合反応物から多孔性シリカゲルを含む部分を破碎して取り出した。このLicbrosorb-重合体膜複合体からなる微粒子を12mMリン酸二水素ナトリウム水溶液(4ml、pH5.6)で7回洗浄して酵素を溶出除去した。

【0015】タンパク質の再結合実験として、濃度0.5mg/100mlのグルコースオキシダーゼと濃度1mg/100mlのグルコースデヒドロゲナーゼ(EC1.1.47)との混合溶液に上記の微粒子を5分間浸漬した後、その上澄溶液を採取し、それぞれの酵素の活性を求めた。熱安定性試験のため、その微粒子を80℃で20分間熱変性させたものについても同様の試験を行った。グルコースデヒドロゲナーゼの酵素活性に対するグルコースオキシダーゼの酵素活性の比の差異を検討した結果、グルコースオキシダーゼは、熱変性微粒子よりも未変性微粒子に9%多く結合することがわかった。実施例3で得られた結果と比較することにより、熱変性処理後にもなお、微粒子にグルコースオキシダーゼを識別する分子形状 castingが存在することを示し、この物質は熱安定性の高いことがわかった。

【0016】

【発明の効果】本発明の物質は、特定のタンパク質を選択的に捕捉する作用、即ち、タンパク質分子の識別機能を有するもので、人工抗体として有利に利用することができる。また、本発明の物質は良好な熱安定性を有し、しかも、使用後、再生して用いることができる。